中華農業研究 (Jour. agric. Res. China) 29 (3) : 195～201 (1980)

蝴蝶蘭葉插組織培養之研究[1]

林 瑞 松[2]

摘要：本研究在探討蝴蝶蘭葉片組織培養明確之配方。1. 蝴蝶蘭經 B_5 無機鹽及有機鹽，myo-inositol100 mg/l, 蔗糖 30 g/l, agar 1%, NAA 5 mg/l, kinetin 10 mg/l 的培養基(pH 5.5)誘導，得癒合組織及芽球相似物突起。經在相同培養基作繼代培養可使分化成幼苗。2. 葉組織培養中，以心葉形成芽球相似物之能力爲最高，而在上表皮形成率較下表皮形成率爲高。3. 由組織切片顯微鏡觀察，芽球相似物之形成是由表皮細胞及其下面細胞分裂而來。同時亦發現維管束鞘附近薄壁細胞，細胞核／細胞質比例大，具有細胞分裂活性。

蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis alliance*) 是一種潔雅美麗爲人喜愛之名貴花卉，素有蘭中之后之稱，近年來東南亞各國及歐美各國無不重視蘭花事業之拓展，尤以泰國蘭花事業在近十年來已發展成爲重要出口之產品，爲泰國賺了不少外匯。本省地理環境如同天然之大溫室，爲數種原種蝴蝶蘭之原產地，極適蝴蝶蘭之栽植。本省有此優良自然環境，倘若配合科技之研究而發展蘭花事業其前途必極爲光明。

蝴蝶蘭栽培方面，首先遭遇之難題爲名貴品種繁殖問題，如果使用生長點培養，必須將一整株寶貴的蘭花犧牲，且取其生長點因操作手續複雜並需精密設備，因此希望保全母株生存下，取其部分器官作繁殖材料，以便獲得簡便且省成本之營養繁殖方法。Churchill *et al* [4] 曾經發表蝴蝶蘭之葉尖培養可繁殖芽球體，但成功率極低，加上使用液體培養基需要有較多設備之困難，且有實用性之疑問，故擬本試驗從事葉插組織培養之研究。田中道男等 [2] 在 1975 年發表用花寶 (Hyponex) 加上生長調節劑可使蝴蝶蘭葉片產生芽球相似物 (protocorn like body, PLB) 但成功率仍偏低，且花寶成分在微量元素及添加劑方面屬商業機密，成分不明。本研究之目的在於探討以分析明確之成分的培養基以求發展蝴蝶蘭葉片扦插繁殖之可行性，以便日後自名貴品種蝴蝶蘭上由其梗芽培育幼苗之葉從事葉插組織培養達到大量無性繁殖的目的。

材料及方法

供試材料係蝴蝶蘭白花品種 (*Phalaenopsis amabilis*) 之實生苗。俱有三枚葉片，其心葉葉寬約 0.5 cm 左右之幼苗。取其心葉，第二葉，第三葉分別試驗。在經殺菌後之固態培養基上培養，pH 5.5，培養基配方包括：

(一) Murashige-Skoog [7] (1962) 之修正配方成分如下：

Murashing-Skoog 配方之主要元素 (macroelements) 及次要元素 (microelements),

1. 臺灣省農業試驗所 研究報告 第 936 號。
2. 本所園藝系技士。臺灣省 臺中縣 霧峰鄉。

myo-inositol 100 mg/l, Nicotinic acid 1.0 mg/l, pyridoxine·Hcl 1.0 mg/l, thiamine·Hcl 10.0 mg/l 及不同濃度之 Naphthaleneaceticacid (NAA) 和 kinetin (詳見表 1) 。

(二) Gamborg *et al* (1968)[6] 之 B_5 配加方以修正：

B_5 配方之主要元素(macroelements)及次要元素 (microelements),myo-inositol 100 mg/l, nicotinic acid 1.0 mg/l, pyridoxin•Hcl 1.0 mg/l, thiamine•Hcl 10.0 mg/l，並加不同濃度之 NAA 和 kinetin。(詳見表 1) 。

兩組所用的蔗糖濃度均爲 3 %所有試驗均在每日光照 12 小時 ， 25°C 恆溫下培養 ，光强 9,000 lux ，經 5～6 週後再作繼代培養試驗。

材料之組織固定，係經 FAA (50% ethyl alcohol 90%, glacial acetic acid 5 ml 及 formalin 5 ml) 固定再經 TBA 系列脫水，以石臘包埋，再用切片機切成 12 μ 蠟帶，並用 Delafied' hematoxylin 法染色，作成永久切片，以便顯微鏡拍照紀錄。

試驗結果

一般單子葉植物的葉片不易在傷口及葉表面有癒合組織形成之現象。蝴蝶蘭亦屬於單子葉植物，本試驗以幼葉葉片在 B_5 修正配方下有芽球相似物產生，其結果列表如下：

表 1. 蝴蝶蘭幼葉在不同培養基下形成芽球相似物之百分率

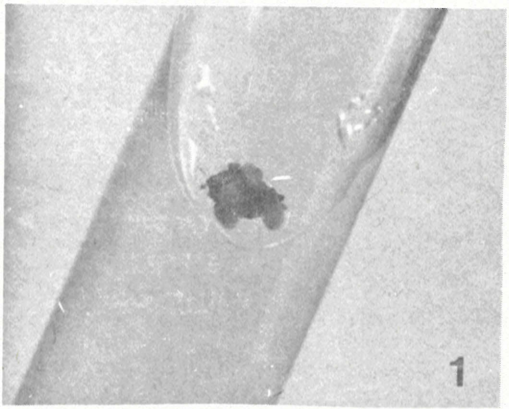
Table 1. Formation of PLB from young leaf tissue on infant phalenopsis at various culture media.

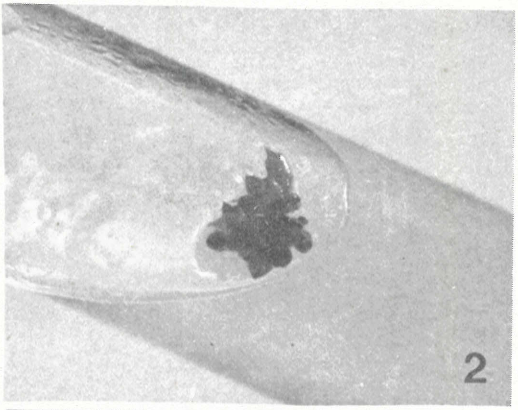
基本培養 Basic medium	基添加生長調節劑 (mg/l) added regulator		實驗數量 No. of explant tested (A)	形成芽球相似物之葉片數 No. of explant formed PLB (B)	B/A X 100%
	NAA	Kinetin			
B_5	2	2	20	2	10%
	5	10	20	7	35%
	5	5	20	12	60%
	10	5	20	5	25%
M. S.	5	10	20	0	0
	5	5	20	0	0
	2	2	20	0	0
	10	5	20	0	0

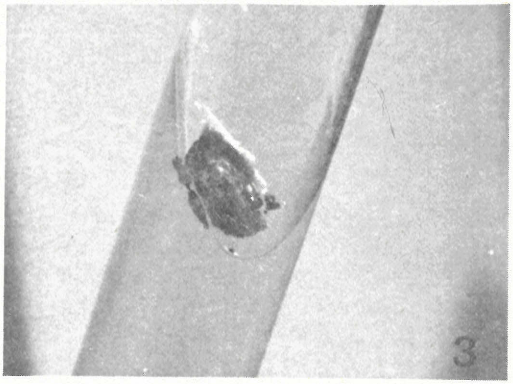
表 2. 蝴蝶蘭幼葉不同葉序形成芽球相似物之比較

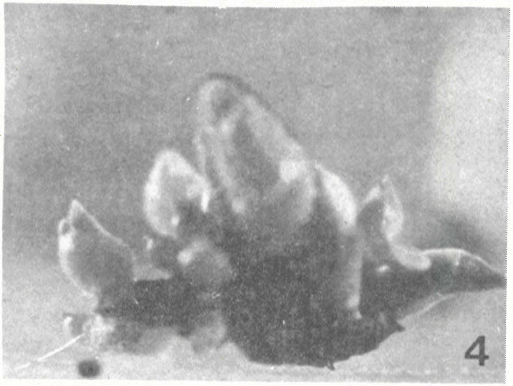
Table 2. Comparative formation of PLB among explants from different orders of young leaf.

葉序 Leaf order	實驗數量 No. of explant tested (A)	形成芽球相似物之葉片數 No. of explant formed PLB (B)	百分比 B/AX 100%	各葉片形成芽球相似物數 No. of PLB in explant		
				最多 (Max.)	最少 (Min.)	平均 Average
心葉 First leaf	20	12	60	6	1	3.5
第二葉 Second leaf	20	2	10	4	1	2.5
第三葉 Third leaf	20	0	—	—	—	—









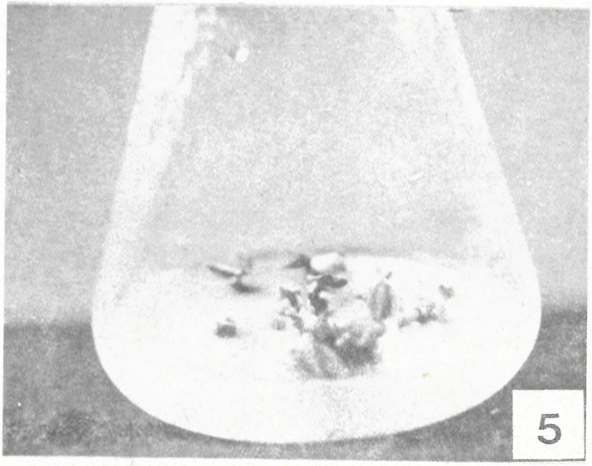


圖 1. 蝴蝶蘭心葉經扦插後，5～6星期培養所形成之芽球相似物。

Fig 1. Formation of PLB on the excised first leaf of infant phalenopsis after 5～6 weeks in culture.

圖 2. 芽球相似物經繼續培養三個月，發育甚快，且無相互抑制現象。

Fig 2. The rapid development and no inhibition each other of PLB was indicated after 3 months tissue culture.

圖 3. 蝴蝶蘭幼苗第二葉經扦插培培養後 5～6星期，所形成芽球相似物甚小。

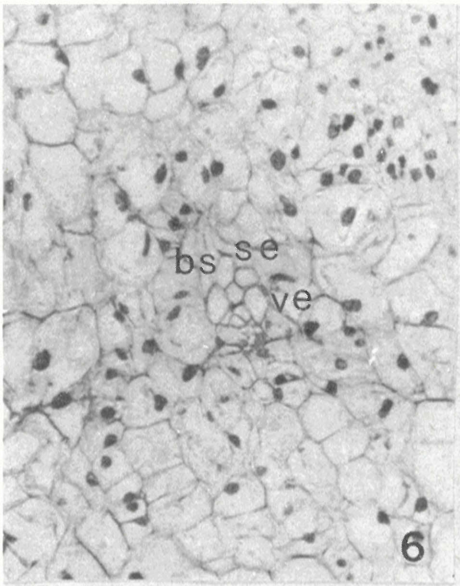
Fig 3. Formation of PLB on the second leaf of the young leaf tissue from infant plant phalenopsis cutting tissue culture after 5～6 weeks but PLB are very small.

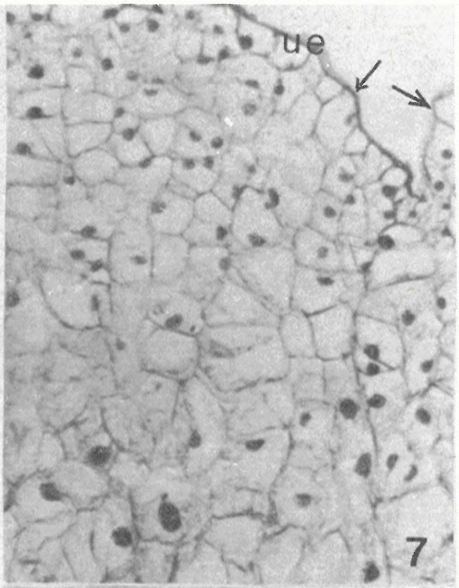
圖 4. 芽球相似物分化成葉與根，亦有形成芽球相似物。

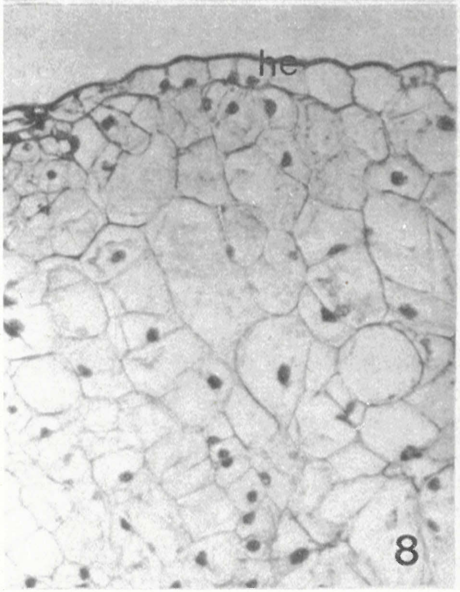
Fig 4. The formation of leaf and root from PLB are capable and PLB also can from PLB too.

圖 5. 由芽球相似物分化完成幼苗費時六個月。

Fig 5. The infant phalenopsis formation from PLB after 6 months.







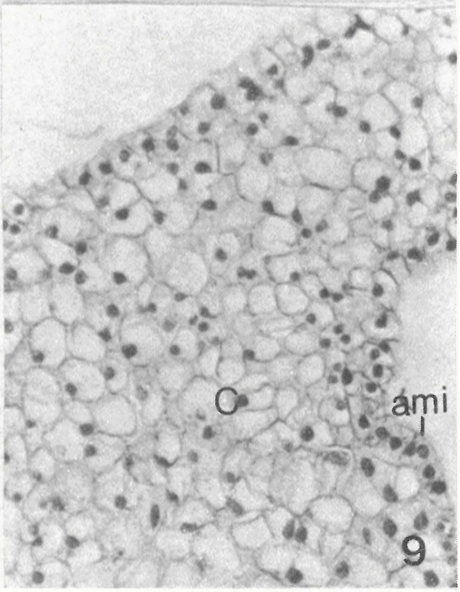


圖 6. 經扦插培養後， 1～2 週可見維管束周圍的數層薄壁細胞開始分裂 se ：篩管 sieve element. ve：導管 vasal element (380X).

Fig 6. The cell devision of parenchyma of vascular bundle had begun after cutting tissue culture 1～2 weeks (380X).

圖 7. 葉上表皮在扦插培養後 3～4 星期有突起產生。（箭頭所指） ue：上表皮 upper epidermis (400X).

Fig 7. The buldge was formed on adaxial surface of leaf after cutting tissue culture 3～4 weeks (400X).

圖 8. 葉下表皮在扦插培養後並無突起產生 he：下表皮 hypo epidermis (400X)

Fig 8. No buldge was formed on abaxial surface of leaf after cutting tissue culture (400X).

圖 9. 在癒傷組織的表面產生分生組織的始原體。c：癒傷組織 callus. ami：分生組織始原體 apical meristem initials. (380X).

Fig 9. The apical meristem initials was formed from callus surface. (380X).

外觀形態上之變化情形：扦插後，整個葉片保持綠色，約 1～2 星期後，葉基部切口處呈現白色癒合組織，約 3～4 星期後，見癒合組織表面有突起現象，且葉表皮亦見突起， 5～6 週後，迅速形成凸起的芽球相似物，（圖1），各芽球相似物之發育甚快，且甚一致，無彼此抑制之現象。（圖2），由試驗觀察，心葉成功率較高，芽體亦較大，而第三葉幾無產生突起。第二葉有突起唯個體甚小（圖3）。所產生之芽球相似物仍於原配方之培養基繼代培養，培養四個月後則有分化成根與葉之現象。同時亦發現有芽球相似物再長芽球相似物之現象（圖4），再經過六個月～七個月則分化發育完成（圖5），形成幼小蘭苗。

解剖觀察：葉片扦插後， 1～2 週則可見維管束周圍的數層薄壁細胞開始分裂（圖6），葉片切口形成癒傷組織， 3～4 週後整個葉片之維管束均參與癒合組織之形成，在靠腹面（adaxial）之部分細胞分裂活性較大，故在靠腹面有突起形成（圖7），而在下表皮因細胞分裂活性較低，並無突起現象（圖 8）。 5～6 週後則隨著癒合組織的生長，癒合組織的表面產生分生組織的始原體（apical meristem initials）（圖9），逐漸長成芽球相似物。

討　　論

蘭科植物以葉組織培養繁殖之研究，始自 1965 年 Wimber[10] 以液體培養使東亞蘭（Cymbidium）葉片長出原生芽球，以後各國相繼踴躍從事蘭科葉組織培養之研究。

本試驗以 phalaenopsis 經葉片扦插後確有癒傷組織產生或芽球相似物形成，可再分化成幼苗。由表一顯示在 B_5 修正配方中，生長調節劑含量以在 NAA 2 mg/l, Kinetin 10 mg/l 產生 PLB 最多，而培養基在含 NAA 5 mg/l 及 Kinetin 2 mg/l 時雖有 PLB 產生，但效果不甚顯著。因此對 phaleanopsis 幼葉逆分化而言，調節劑含量至少在 NAA 2 mg/l 及 Kinetin 2m g/l 以上始有效果。1971 年林氏[1]以 M. S. 修正配方在 NAA 1 ppm 即可使 cymbidium 葉組織逆分化。故 phalaenopsis 之逆分化所需調節劑量較 cymbidium 爲高。

就本試驗中， B_5 與 M. S. 修正配方效果之比較， M. S. 配方塡加以 B_5 修正配方之同樣調節劑及維他命類却無 PLB 產生，配方中無機鹽不同含量其效果亦不同。配方比較， B_5 修正配方硝酸鉀含量較高外，其餘無機鹽類均是 M. S. 修正配方較高。是否 phalaenopsis 幼葉逆分化中對鉀離子有敏感之反應，或硝酸態氮有利於逆分化之作用，尙待進一步研究。

由表二顯示，第三葉無 PLB 產生，而心葉（第一葉）同第二葉均有 PLB 產生，此現象與葉齡有關，即葉齡愈大，則分化愈完全，如欲令其逆分化，成功率愈低。伊藤，田上[3]以萬代蘭 *Vanda coerulea* 試驗，認爲與表皮之厚膜細胞之分佈有關。又，第二葉培養所產生之 PLB 細小，隨後大部分枯褐死亡。由此可知心葉（第一葉）之培養具有商業之實用性。由圖 1、圖2 所示 PLB 之發育並無相互抑制之現象，每一 PLB 均衡發育。 1971 年林氏[1]謂以 cymbidium 葉插所產生芽球，發育較佳者會抑制其他芽球生長，與本試驗之結果不同。可能林氏[1]所試驗之材料不同種類，而植物之構造與生理亦有所不同，故有不同之結果。圖4 、圖5 顯示於 B_5 修正配方中之最佳培養基以 PLB 作繼代培養則可見其分化發育成根與葉，且有部分繼續產生 PLB 。此顯示在同一調節劑濃度下可造成分化與逆分化。

由圖7、圖8 比較上下表皮之葉組織培養有不同結果。圖7 所示上表皮有突起現象如箭頭所示表皮變成不平整之表面，而圖 8 所示下表皮無突起現象如圖所示下表皮表面平整。此可根據 Esau[5] 之研究解釋，其謂關於葉插發生之不定根、不定芽之來源有多種不同之方式；通常在葉片之上表皮及附近之葉肉細胞形成芽，而由維管束形成層附近之薄壁細胞組織中形成根源體，即不定芽的發生多屬外生的的（exogenous）。Priestley & Swingle[8]認爲不定芽之形成不是由單一細胞而來，而是由一羣細胞分裂分化之結果。田中道男[2]認爲 phalaenopsis 蝴蝶蘭幼葉 PLB 之產生，是由表

皮細胞下之細胞分裂而來。此與本試驗圖 7 所示甚爲相同，圖 7 所示之突起乃是細胞分裂向外擠出所造成。至於造成上下表皮之差異原因，由圖 7 、圖 8 可明顯看出，上表皮細胞小，細胞核／細胞質之比例大，因此細胞分裂活性較大，具有較强分裂能力。

圖 9 顯示在葉基部產生之癒傷組織表面產生分生組織之始原體，向外繼續分裂，可以從此分裂之細胞羣聚 (cell cluster) 培養成芽球體或芽球相似物。此現象在 1970 年， Stewart *et al* [9] 以 cymbidium 蘭爲材料，其結果亦有發現。

引 用 文 獻

1. 林景訓． 1971 ．東亞蘭葉插產生不定芽之研究，國立臺灣大學園藝研究所碩士論文。
2. 田中道男、長谷川暄、五井正憲． 1975 ．單莖性ラン種植物の組織培養による榮養繁殖に關する研究 第一報 日本園藝學會雜誌 44 (1) ：47-58．
3. 伊藤五彥、田上喬一．1972．洋ラン論文堂．新光社 (日本蘭協會編) ：103-105．
4. Churchill, M. E., J. Arditti and E. A. Ball. 1971. Clonal propagation of orchids from leaf tips. Am. Orchid Soc. 40 : 109-113.
5. Esau, K. 1965. Plant anatomy. 2nded. John Wiley & Sons Inc. New York.
6. Gamborg, O. L., R. A. Miller and K. Ojima. 1968. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. Res. 50 : 151-158.
7. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol plant. 15 : 473-497.
8. Priestley, J. H. and C. F. Swingle. 1929. Vegetative progagation from the standpoint of plant anatomy. U. S. Dept. Agr. Tech. Bull. 151.
9. Steward, F. C. and M. O. Mapes. 1971. Morphogenesis in aseptic cell cultures of cymbidium. Bot. Gaz. 132 (1) : 65-70.
10. Wimber, D. E. 1965. Additional observations on clonal multiplication of cymbidium through culture of shoot meristem. Cymbidium Society News. 20 : 7-20.

Studies on the clonal propaganion of *Phalaenopsis* by leaf tissue culture[1]

Ruey Song Lin[2]

Summary

An investigation of finding the clear and good media were carried out in order to establish the method of clonal propagation by leaf tisue culture in *Phalaenopsis.*

Calli and protocorm-like bodies (PLB)were induced from leaf tissue *Phalaenopsis* of in a basal medium containing Gamborg's B_5 salts, 100 mg/l of myoinositol, 30 g/l of sucrose, 10 g/l of agar, 5 mg/l of NAA and 10 mg/l of kinetin, the pH was adjusted to 5.5. Plantlets were also induced by subculture in the same medium.

The ability of PLB formation was higher in the first than in the second and third leaves of ths explant of infant seedling. It was obssrved that PLB occured most frequently on the adaxial rather than the abaxial surface of the leaves.

Studies by light microscopy indicated that PLB formed might be deried from cells just below the epidermal layer. This is further demonstrated by the high nucleus/cytoplasm ratio and active cell division of the parenchyma cells in the bundle sheath tissues.

1. Contribution No. 936 from the Taiwan Agricultural Institute.

2. Horticulturist, Department of Horticullture, TARI. Wufeng, Taichung Hsien, Taiwan 431, ROC.